昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2011, 54(9): 1018－1026　　ISSN 0454-6296

二斑叶螨两种群中 *Wolbachia* 诱导的胞质不亲和作用的影响因子比较研究

陆明红，谢蓉蓉，赵臻君，于明志，薛晓峰，洪晓月*
（南京农业大学昆虫学系，南京 210095）

摘要：*Wolbachia* 诱导胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI)是对寄主的生殖调控中最常见的一种方式，在不同种群中 CI 表达的差异较大。以二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 辽宁兴城(LN)和江苏徐州(JS)两个地理种群为实验材料，经筛选获得 100% 感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的品系，通过杂交实验和实时定量 PCR 的方法研究寄主遗传背景、雄螨日龄、温度以及雄螨体内 *Wolbachia* 菌量等因子对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 能力的影响。结果表明：1，3，5 和 7 日龄的雄螨诱导的 CI 的强度没有差异，表明雄螨日龄对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的能力没有影响。二斑叶螨分别放在 20℃的低温、25℃的适温和 30℃的高温条件下饲养时，*Wolbachia* 诱导 CI 的能力也没有任何变化，表明温度对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的能力也没有影响。江苏徐州种群所感染 *Wolbachia* 菌量显著高于辽宁兴城种群，并且这两个种群感染 *Wolbachia* 菌量都随着雄螨日龄的增大而显著增加，表明 *Wolbachia* 菌量对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的能力没有影响；江苏徐州种群内 *Wolbachia* 不能诱导 CI 可能是 *Wolbachia* 株系与寄主的遗传背景共同作用的结果。研究结果为进一步了解 *Wolbachia* 的生殖调控机理提供了重要依据。

关键词：二斑叶螨；*Wolbachia*；胞质不亲和；日龄；温度；菌量
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)09-1018-09

A comparative study of factors influencing the expression of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in two populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

LU Ming-Hong, XIE Rong-Rong, ZHAO Zhen-Jun, YU Ming-Zhi, XUE Xiao-Feng, HONG Xiao-Yue*
(Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The cytoplasmic incompatibility (CI) is the most common effect of *Wolbachia* on the reproduction of its arthropod hosts, and the expression of CI differs greatly among different populations. Using the Jiangsu (JS) and Liaoning (LN) populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), as experimental materials, 100% infected and uninfected *Wolbachia* lines were obtained by screening. The present study tried to evaluate some factors influencing the expression of CI in the spider mite by crossing experiment and Real-time quantitative PCR. These factors include age of host, temperature, host genes and *Wolbachia* density. The 1, 3, 5, 7-day-old virgin males were used to investigate the influence of host age on *Wolbachia*-induced CI. The results showed no effect of age on CI, suggesting that host age does not reduce the sperm modification induced by *Wolbachia*. The effect of temperatures (20℃, 25℃ and 30℃) on the CI induced by *Wolbachia* was also checked. Neither high nor low temperatures influenced the expression of CI. *Wolbachia* density in males of the JS population, as measured by quantitative PCR using the wsp (surface protein of *Wolbachia*) gene, was significantly higher than that in the LN population. In addition, in both the JS and LN populations, *Wolbachia* density increased with the age of male hosts. *Wolbachia* density also showed no effect on CI. We estimated the variability of CI expression between the JS and LN population of *T. urticae* was due to the interaction between *Wolbachia* and host genotypes. The results might provide foundation for understanding the mechanisms of reproductive manipulation induced by *Wolbachia*.

Key words: *Tetranychus urticae*; *Wolbachia*; cytoplasmic incompatibility; age; temperature; bacterial density

---

基金项目：国家自然科学基金项目(30871635)；国家公益性行业(农业)科研专项(201103020)
作者简介：陆明红，女，1986 年生，江苏盐城人，硕士，研究方向为昆虫分子生态与进化，E-mail：2008102076@njau.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：xyhong@njau.edu.cn
收稿日期 Received：2011-03-10；接受日期 Accepted：2011-06-07

Wolbachia 对寄主的生殖调控中，诱导胞质不亲和(CI)是最常见的一种方式，在蛛形纲、甲壳纲等足目物种以及昆虫纲中均有报道(Breeuwer and Jacobs, 1996; Moret *et al.*, 2001; Vavre *et al.*, 2001, 2002)。在同一物种里，感染 *Wolbachia* 的雄虫与未感染 *Wolbachia* 的雌虫交配(unidirectional CI，单向胞质不亲和)或感染不同品系 *Wolbachia* 的雌雄个体交配(bidirectional CI，双向不亲和)，往往产生不亲和现象(O'Neill and Karr, 1990)。胞质不亲和往往表现为后代胚胎死亡和/或性比偏重雄性(O'Neill *et al.*, 1997)。胞质不亲和(CI)产生的分子机理仍然不清楚，但是从细胞学的角度已经将 CI 的过程描述得较清楚了。第一次有丝分裂时，来自父本的染色质不能及时浓缩，核膜降解推迟，而来自母体的染色质浓缩正常，导致父本和母本的原核进入有丝分裂的时间不同。*Wolbachia* 通过诱导胞质不亲和给感染的个体提供生殖优势，从而促进其在种群内扩散(Hoffmann *et al.*, 1990)。

我们实验室先前的研究发现，*Wolbachia* 在二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 不同种群里所引起的 CI 强度不同，江苏徐州种群体内的 *Wolbachia* 不能诱导 CI，而辽宁兴城体内的 *Wolbachia* 能诱导中等强度的 CI(Xie *et al.*, 2011)。Perrot-Minnot 等(2002)对欧洲的二斑叶螨的研究也发现，*Wolbachia* 能诱导不同表型、不同强度的 CI，但是对影响 CI 的因子并没有进行深入的研究。对果蝇的研究发现，影响果蝇体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的因素较多，包括 *Wolbachia* 株系、寄主遗传背景、共生菌密度以及环境因素(McGraw *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2005)。而环境因素又包括营养条件(Sinkins *et al.*, 1995; Clancy and Hoffmann, 1998)、雄虫交配次数(Karr *et al.*, 1998)、雄虫日龄(Turelli and Hoffmann, 1995; Kittayapong *et al.*, 2002; Reynolds and Hoffmann, 2002)等因素。

本文以中国二斑叶螨的辽宁兴城和江苏徐州两个地理种群为研究材料，研究寄主遗传背景、雄虫日龄、*Wolbachia* 菌量以及温度等因子对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 能力的影响。寄主二斑叶螨的亲缘关系用线粒体基因、核基因进行比较。以往对我国二斑叶螨的核糖体 DNA 中的 ITS2 区段序列进行测定和分析发现，二斑叶螨 13 个地理种群的 ITS2 序列完全一致(Xie *et al.*, 2008)。在本文中，我们对两个地理种群的感染品系的线粒体 DNA (mitochondrial cytochrome oxidase I, COI)基因序列比较分析。Mouton 等(2006)的研究发现，温度能影响 *Wolbachia* 在寄主中的密度(density)。但是温度能否影响二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的能力还是未知的。因此除了已报道的 25℃下 *Wolbachia* 的作用(Xie *et al.*, 2011)，我们另外设置了 20℃的低温和 30℃的高温，研究温度对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的强度的影响。到目前为止，雄螨日龄对二斑叶螨内 *Wolbachia* 菌量以及诱导 CI 的强度的影响还未见报道。因此，我们从江苏徐州和辽宁兴城两个种群分别选取 1, 3, 5 和 7 d 的雄螨研究雄螨日龄对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 菌量以及 *Wolbachia* 诱导 CI 的强度的影响。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

二斑叶螨辽宁兴城地理种群(LN)(40.36°N, 120.42°E)采集于 2002 年 8 月，江苏徐州地理种群(JS)(34.41°N, 116.35°E)采集于 2003 年 7 月，寄主植物都为苹果 *Malus pumila* Mill.。采样时，叶片上的二斑叶螨存在多种虫态，包括卵、若螨和成螨。经鉴定确认种类后，在实验室用隔水法在豇豆 *Phaseolus vulgaris* L. 叶片上进行隔离饲养，饲养条件为 25±1℃，相对湿度 60%。

1.2　二斑叶螨总 DNA 提取、PCR 扩增和测序

DNA 的提取方法、共生菌 *Wolbachia* 的 PCR 检测、扩增体系和条件等详见苗慧等(2004)。

本文使用一对特异性引物(Navajas *et al.*, 1996)从二斑叶螨线粒体 DNA 的 COI 基因中扩增出一段 453 bp 的片段。上游引物为：5′-TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG-3′，下游引物为：5′-TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3′。

每 50 μL 扩增反应体系含：4 μL DNA 模板，28.6 μL ddH_2O，5 μL 10×buffer，5 μL $MgCl_2$(25 mmol/L)，4 μL dNTPs(10 mmol/L each)，0.4 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL，大连 TaKaRa 公司)，上游和下游引物各 1.5 μL(20 μmol/L)。

PCR 反应条件为：94℃预变性 5 min；接着 94℃ 30 s，51℃ 1 min，72℃ 1 min 共 35 个循环。

利用 V-gene Biotechnology Limited 公司的 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，将纯化产物连接至 Promega 公司的 pGEM-T 载体，并进一步转化到感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 中，进行

培养。

经蓝白斑和氨苄筛选，重组质粒经扩大培养，碱裂解法提取质粒 DNA 及 PCR 检测后，将阳性克隆用于测序。所有测序工作均由大连 TaKaRa 公司完成。每个地理种群随机抽取 6 个已感染 *Wolbachia* 的样本进行序列测定，以它们的一致序列为准。

1.3 筛选 100% 感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的品系

经 PCR 检测，二斑叶螨辽宁兴城种群和江苏徐州种群都感染 *Wolbachia*，但不是每个个体都感染，要经过筛选才能得到 100% 感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的品系。本文是用各自种群所携带的 *Wolbachia* 菌株分别获得 100% 感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的品系。

1.3.1 筛选 100% 感染 *Wolbachia* 的品系：100% 感染 *Wolbachia* 的品系筛选使用孤雌回交的方法(Hong *et al*., 2002)。在豇豆叶上接入静Ⅲ时期的雌若螨 1 头(未经交配)，让其孤雌生殖。等到所产卵发育为雄成螨时，与其母本回交。回交两天后，将母本移到新鲜叶片上使其产卵 3 ~ 5 d 后，检测母体内是否含有 *Wolbachia*。将含有 *Wolbachia* 的母本所产生的后代重复以上步骤 4 ~ 5 代，然后 PCR 检测后代雌成螨 30 头，全部感染 *Wolbachia*，则获得完全感染 *Wolbachia* 的品系，否则继续回交。达到 100% 则可用于杂交实验。

1.3.2 筛选 100% 不感染 *Wolbachia* 的品系：将豇豆叶置于海绵上，在 0.1% (w/v) 的四环素浸泡 24 h 后，用于饲养刚孵化出的幼螨。每天加水，4 d 换一次叶子，每处理一代 PCR 检测 40 头雌成螨，完全不感染则获得 100% 不感染 *Wolbachia* 的品系。在用于杂交实验前，获得的不感染品系在无四环素的条件下饲养 4 代，以避免四环素可能带来的不利影响。同时使用前 PCR 检测雌螨 40 头，确认各品系 100% 不感染 *Wolbachia*。

1.4 杂交实验

1.4.1 雄螨日龄对 CI 的影响：从完全感染品系中挑取一些静Ⅲ态雌虫进行产雄孤雌生殖。等到所产的卵发育为雄成螨时，每天早晨 8:00 将前一天孵化的雄成螨挑除，8 h 后挑取刚孵化的雄成螨放置于新叶片上并饲养 1，3，5 和 7 d。1，3，5 和 7 日龄的雄螨分别与新孵化未经交配的不感染 *Wolbachia* 的雌螨进行交配。杂交实验的具体操作方法为：做杂交组合时，取新鲜叶片，每个叶片划分成几个面积均约在 4 cm^2 左右的圆形小区，分别挑取单个(成熟前的最后一个静止期)不感染的雌螨和感染 *Wolbachia* 的雄螨一起放到叶片的小区中，每个小区只放 1 对。雌虫蜕皮成为成熟个体的 2 d 后将雄虫移走。从开始产卵的第 1 天算起，产卵 5 d后移走雌虫。每天检查并记录卵数，卵孵化数，幼虫成活数，雌螨和雄螨数。如果发现亲代雄成螨在雌螨产卵前死亡，要及时补充雄成螨；如果发现亲代雌成螨产卵未满 5 d 就死亡，此数据作废。最后，根据每天记录的数据计算出孵化率、存活率和性比，作为衡量 CI 强度的指标。

1.4.2 温度对 CI 的影响：将辽宁兴城种群与江苏徐州种群筛选得到的 100% 感染 *Wolbachia* 和 100% 不感染 *Wolbachia* 的品系放于 20℃ 和 30℃ 下饲养一代，一代后 PCR 检测 *Wolbachia* 的感染情况以确定感染品系的 *Wolbachia* 没有丢失后进行杂交实验。各地理种群均以感染 *Wolbachia* ♀ × 感染 *Wolbachia* ♂，不感染 *Wolbachia* ♀ × 感染 *Wolbachia* ♂，感染 *Wolbachia* ♀ × 不感染 *Wolbachia* ♂，不感染 *Wolbachia* ♀ × 不感染 *Wolbachia* ♂ 4 种杂交组合在 20℃ 的低温和 30℃ 的高温下进行杂交实验。本实验选用 3 – 5 日龄的雄螨作为杂交对象，检验 *Wolbachia* 对各地理种群生殖的影响是否受到温度的影响。每个杂交重复的父母本在产卵 5 d 后进行 PCR 检测确定感染状态。

1.5 实时定量 PCR 检测 *Wolbachia* 的菌量

设计 *Wolbachia* 的特异性引物 *wsp*F (5′-GCAGCGTATGTAAGCAATCC-3′) 和 *wsp*R (5′-ACCAAAATAACGAGCACCAG-3′) 扩增 144 bp 的序列，对 *Wolbachia* 进行定量。使用 ABI 公司的 7300 型定量 PCR 仪和 TaKaRa 公司的 SYBR 荧光定量试剂盒。

总体积为 20 μL 的 PCR 反应体系为：1 μL 的 DNA 模板，10 μL 的 SYBR 试剂，0.4 μL 的 Rox Dye，7.8 μL 的 ddH_2O，上下游引物各 0.4 μL(10 μmol/L)。PCR 反应条件为：95℃ 预变性 30 s，95℃ 5 s，60℃ 31 s，40 个循环。

大连 TaKaRa 公司质粒小量提取试剂盒提取质粒。质粒提好后，用分光光度计在 260 nm 下测定质粒的浓度，然后以 10 倍的梯度稀释质粒。标准曲线的制定使用稀释倍数为 10^{-1} ~ 10^3 的质粒标准样。

感染 *Wolbachia* 品系分别挑取孵化后饲养了 1 ~ 10 d 的雄螨各 6 头用于定量实验，研究菌量与

日龄的关系，同时比较辽宁兴城与江苏徐州种群感染的 *Wolbachia* 菌量，研究 *Wolbachia* 菌量对 *Wolbachia* 诱导 CI 的影响。用 Mann-Whitney *U*-test 方法进行统计分析。

1.6　数据统计与分析

用 Kruskal-Wallis test 或 ANOVA（analysis of variance）软件，分析产卵量、孵化率、存活率和性比，均值的多重比较用 Turkey test。在进行 ANOVA 分析前，对产卵量进行 ln 转换，而孵化率、存活率和性比先用反正弦平方根进行数据预处理，从而保证数据为正态分布以及等方差。

2　结果

2.1　两个二斑叶螨地理种群 COI 基因序列比较

我们使用一对特异性引物从二斑叶螨线粒体 DNA 的 COI 基因中扩增出一段 453 bp 的片段（GenBank 登录号：HM486513），并利用 GenBank 中 Blast 序列比对分析确定该片段是需要的目的片段。通过 GeneDoc 软件比较辽宁兴城和江苏徐州 COI 基因发现，这两个地理种群的 COI 基因序列完全一致，如图 1 所示。

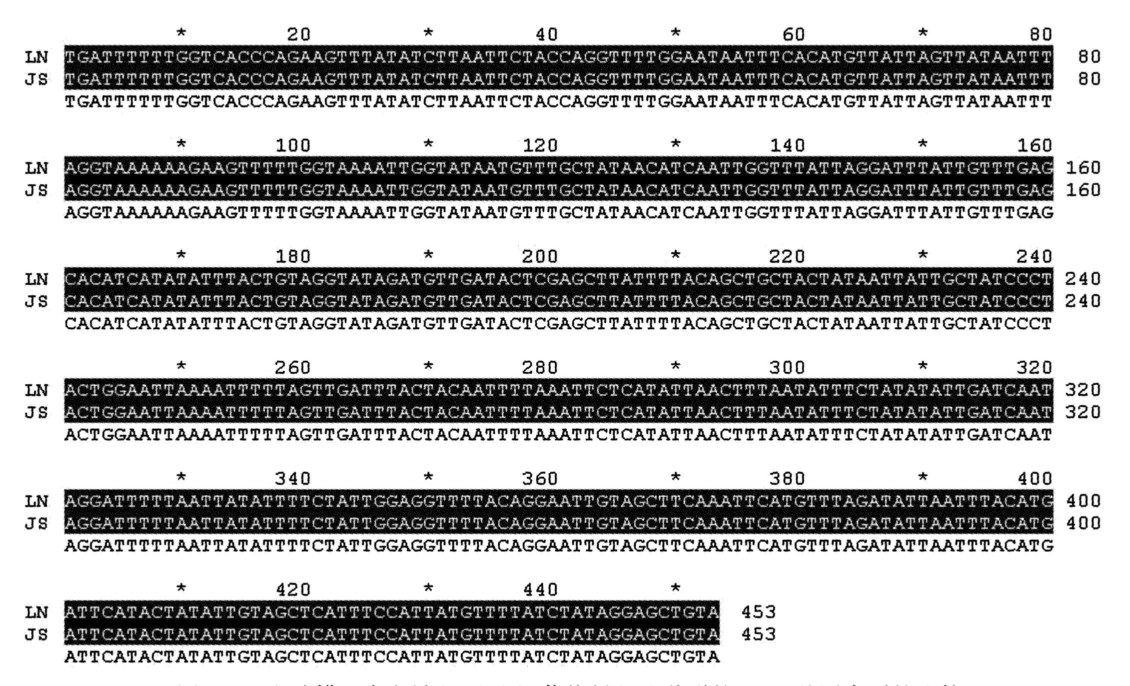


图 1　二斑叶螨辽宁兴城（LN）和江苏徐州（JS）种群的 COⅠ基因序列的比较

Fig. 1　Comparison between COⅠ gene sequences of the Liaoning (LN) and Jiangsu (JS) populations of *Tetranychus urticae*

2.2　雄虫日龄对 CI 的影响

雄螨日龄对辽宁兴城种群内 *Wolbachia* 诱导 CI 的强度影响的结果见表 1。不同日龄感染的雄螨与不感染 *Wolbachia* 的雌螨杂交，后代的孵化率、存活率及性比均没有显著的差异，因此诱导 CI 的强度没有显著差异。雄螨日龄对江苏徐州种群内 *Wolbachia* 诱导 CI 的强度影响的结果见表 2。同样，后代的孵化率、存活率及性比均没有显著的差异（$P>0.05$），江苏徐州种群内的 *Wolbachia* 不能诱导 CI 并不是由雄虫日龄的老化而引起的。

2.3　温度对 CI 的影响

在 20℃ 低温下 *Wolbachia* 对二斑叶螨辽宁兴城（LN）和江苏徐州（JS）种群生殖影响的结果见表 3。辽宁兴城种群感染的 *Wolbachia* 在 20℃ 依然能诱导 CI，感染 *Wolbachia* 的雄螨与不感染的雌螨杂交后代的孵化率和性比都显著低于其他 3 个杂交组合。而江苏徐州种群体内感染的 *Wolbachia* 在 20℃ 的低温下依然不能诱导 CI。

在 30℃ 高温下 *Wolbachia* 对二斑叶螨 *T. urticae* 辽宁兴城（LN）和江苏徐州（JS）种群生殖影响的结果见表 4。同样，在 30℃ 高温下，辽宁兴城种群感染的 *Wolbachia* 也能诱导 CI，而江苏徐州种群感染的 *Wolbachia* 不能诱导 CI。由此可见，江苏徐州种群内的 *Wolbachia* 不能诱导 CI 与饲养温度无关。

表 1 雄螨日龄对二斑叶螨辽宁兴城(LN)种群内 *Wolbachia* 诱导 CI 的影响

Table 1 Effect of male age on the level of CI induced by *Wolbachia* infection in the Liaoning (LN) population of *Tetranychus urticae*

雄螨日龄(d) Age of the male	数量 Number of individuals	产卵量 Number of eggs laid per female	孵化率(%) Hatchability	存活率(%) Survival rate	雌螨率(%) Percent of female offsprings
1	39	28.28 ± 1.21 b	48.95 ± 2.43	92.10 ± 6.94	34.91 ± 2.98
3	17	22.29 ± 1.43 a	51.24 ± 2.52	81.38 ± 3.76	39.28 ± 4.34
5	23	22.30 ± 1.24 a	51.54 ± 2.62	89.16 ± 3.51	42.49 ± 3.02
7	19	25.95 ± 1.82 ab	48.34 ± 2.77	85.60 ± 2.50	37.06 ± 5.64
$F_{3,94}$ [a]		4.829 **	0.329 ns	0.575 ns	0.816 ns

[a]表示平均值(± *SE*)在 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)和 $P < 0.001$ (***)时差异显著, ns 表示没有显著差异(ANOVA)。同一列的数值后面不同的字母代表 $P < 0.05$ 时差异显著(Tukey HSD test)。下同。[a] means analysis of variance (ANOVA) of mean (± *SE*) at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***), and ns means no significant difference. Different letters behind the values of the same column mean significant difference at $P < 0.05$ (Tukey HSD test). The same below.

表 2 雄螨日龄对二斑叶螨江苏徐州(JS)种群内 *Wolbachia* 诱导 CI 的影响

Table 2 Effect of male age on the level of CI induced by *Wolbachia* infection in the Jiangsu (JS) population of *Tetranychus urticae*

雄螨日龄(d) Age of the male	数量 Number of individuals	产卵量 Number of eggs laid per female	孵化率(%) Hatchability	存活率(%) Survival rate	雌螨率(%) Percent of female offsprings
1	16	20.23 ± 1.56 a	86.44 ± 2.68	89.45 ± 2.23	76.65 ± 2.24
3	19	26.05 ± 1.52 ab	90.37 ± 1.56	93.48 ± 1.34	73.09 ± 1.96
5	17	22.08 ± 1.34 ab	87.77 ± 2.71	92.38 ± 1.90	74.96 ± 2.80
7	20	27.36 ± 2.27 b	90.74 ± 2.11	92.52 ± 1.85	77.69 ± 1.94
$F_{3,68}$ [a]		3.598 *	0.858 ns	0.930 ns	0.904 ns

表 3 20℃下 *Wolbachia* 对二斑叶螨辽宁兴城(LN)和江苏徐州(JS)种群生殖的影响

Table 3 Compatibility of crosses between *Wolbachia*-infected (W) and antibiotic-treated (U) colonies of Liaoning (LN) and Jiangsu (JS) populations of *Tetranychus urticae* at 20℃

种群 Population	组合类型 Cross type (♀ × ♂)	数量 Number of individuals	产卵量 Number of eggs laid per female	孵化率(%) Hatchability	存活率(%) Survival rate in immature stage	雌螨率(%) Percent of female offsprings
辽宁种群	LN (U) × LN (U)	20	26.75 ± 1.44 bc	90.46 ± 2.17 b	86.26 ± 1.68 ab	69.73 ± 2.12 b
Liaoning population	LN (U) × LN (W)	32	29.91 ± 1.02 c	46.79 ± 2.83 a	77.51 ± 3.15 a	32.29 ± 3.77 a
(LN)	LN (W) × LN (U)	23	20.52 ± 1.32 a	93.53 ± 1.40 b	88.37 ± 2.06 b	74.20 ± 1.69 b
	LN (W) × LN (W)	19	23.45 ± 1.50 ab	95.67 ± 1.47 b	84.64 ± 2.13 ab	72.23 ± 1.73 b
	$F_{3,90}$ [a]		11.403 ***	119.320 ***	3.845 *	55.351 ***
江苏种群	JS (U) × JS (U)	24	22.50 ± 1.47 ab	94.47 ± 1.23	97.84 ± 0.77	80.01 ± 1.32 a
Jiangsu population	JS (U) × JS (W)	37	19.57 ± 1.29 a	94.72 ± 1.28	98.87 ± 0.64	89.48 ± 1.02 b
(JS)	JS (W) × JS (U)	23	27.09 ± 1.51 b	94.45 ± 0.76	99.33 ± 0.31	90.45 ± 0.60 b
	JS (W) × JS (W)	19	21.63 ± 1.64 ab	95.74 ± 0.97	97.30 ± 1.16	87.70 ± 1.11 b
	$F_{3,106}$ [a]		4.906 **	0.205 ns	1.394 ns	18.762 ***

表 4　30℃下 *Wolbachia* 对二斑叶螨辽宁兴城（LN）和江苏徐州（JS）种群生殖的影响

Table 4　Compatibility of crosses between *Wolbachia*-infected（W）and antibiotic-treated（U）colonies of Liaoning（LN）and Jiangsu（JS）populations of *Tetranychus urticae* at 30℃

种群 Population	组合类型 Cross type（♀×♂）	数量 Number of individuals	产卵量 Number of eggs laid per female	孵化率（%） Hatchability	存活率（%） Survival rate	雌螨率（%） Percent of female offsprings
辽宁种群	LN（U）×LN（U）	21	32.33 ± 1.43	95.24 ± 0.94 b	94.26 ± 0.86 ab	77.42 ± 1.58 b
Liaoning population	LN（U）×LN（W）	24	32.13 ± 1.35	42.57 ± 3.00 a	84.59 ± 1.99 a	35.45 ± 4.88 a
（LN）	LN（W）×LN（U）	21	34.95 ± 2.01	96.12 ± 0.84 b	90.26 ± 1.26 b	73.23 ± 0.89 b
	LN（W）×LN（W）	20	37.65 ± 1.66	91.40 ± 1.59 b	90.25 ± 1.23 ab	81.09 ± 1.93 b
	$F_{3,82}$ [a]		2.522 ns	192.802 ***	7.831 ***	52.722 ***
江苏种群	JS（U）×JS（U）	20	30.85 ± 1.59	93.35 ± 1.53	92.83 ± 1.04 ab	76.18 ± 1.23 a
Jiangsu population	JS（U）×JS（W）	22	30.14 ± 1.39	93.25 ± 1.75	89.87 ± 1.31 a	73.82 ± 1.60 a
（JS）	JS（W）×JS（U）	22	30.77 ± 1.47	96.20 ± 0.64	93.64 ± 0.83 ab	78.51 ± 1.09 ab
	JS（W）×JS（W）	25	26.76 ± 1.32	93.05 ± 0.96	94.51 ± 0.86 b	82.89 ± 1.14 b
	$F_{3,106}$ [a]		1.957 ns	1.388 ns	4.014 *	9.669 ***

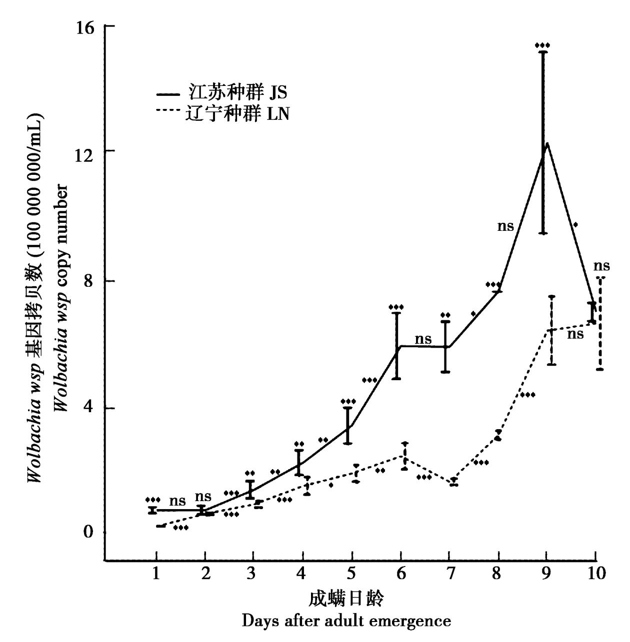


图 2　雄螨日龄对二斑叶螨辽宁兴城（LN）与江苏徐州（JS）种群 *Wolbachia* 菌量的影响

Fig. 2　Effect of male age on *Wolbachia* density in Liaoning（LN）and Jiangsu（JS）populations of *Tetranychus urticae*

图中各点代表平均值 ± 标准误 Each point in the figure represents the mean ± *SE*. ns：差异不显著 No significant difference（$P > 0.05$）；* $P < 0.05$；** $P < 0.01$；*** $P < 0.001$（Mann-Whitney *U*-test）.

2.4　*Wolbachia* 菌量的检测

随着雄螨日龄增加，江苏徐州与辽宁兴城种群 *Wolbachia* 菌量的变化趋势见图 2。对于江苏徐州种群，从第 1 – 9 天 *Wolbachia* 菌量均显著上升（$7.12 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7 \sim 1.23 \times 10^9 \pm 0.06 \times 10^9$ 拷贝数/mL，$P < 0.001$，Mann-Whitney *U*-test）；第 10 天菌量与第 9 天相比有所下降（$6.97 \times 10^8 \pm 0.07 \times 10^8$ 拷贝数/mL）。对于辽宁兴城种群，从第 1 – 6 天 *Wolbachia* 菌量均显著上升（$2.08 \times 10^7 \pm 0.02 \times 10^7 \sim 2.42 \times 10^8 \pm 0.09 \times 10^8$ 拷贝数/mL，$P < 0.001$，Mann-Whitney *U*-test）。第 7 天菌量有所回落（$1.61 \times 10^8 \pm 0.02 \times 10^8$ 拷贝数/mL）；8 d 后菌量以更快的速度上升，第 10 天菌量上升到 $6.60 \times 10^8 \pm 0.03 \times 10^8$ 拷贝数/mL。江苏徐州与辽宁兴城两种群间比较发现，第 1 – 9 天，江苏徐州种群 *Wolbachia* 菌量显著高于辽宁兴城种群，并且江苏徐州种群 *Wolbachia* 菌量上升速度显著快于辽宁兴城种群；第 10 天，江苏徐州种群 *Wolbachia* 菌量显著下降后与辽宁兴城种群菌量没有显著差异。

3　讨论

3.1　雄虫日龄对 CI 的影响

本研究首次报道雄螨日龄对二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 强度的影响。研究发现，中国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 强度不受雄虫日龄的影响。而在大多数物种中，CI 的强度与雄虫的日龄成反比。雄虫日龄对 *Wolbachia* 诱导 CI 能力的影响在果蝇（Turelli and Hoffman，1995；Reynolds and Hoffmann，2002）、白背飞虱 *Sogatella furcifera*（Noda *et al.*，2001）、白纹伊蚊 *Aedes albopictus*（Kittayapong *et al.*，2002）和 *Armigeres sublbatus*

(Jamnongluk *et al*., 2000)等物种中均有报道。Noda 等(2001)对灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 和白背飞虱 *S. furcifera* 体内 *Wolbachia* 的研究发现，这两种飞虱体内的 *Wolbachia* 的序列完全一致，灰飞虱体内 *Wolbachia* 能诱导高强度的 CI，而白背飞虱体内的 *Wolbachia* 诱导相对较低强度的 CI。而随着日龄的增加，白背飞虱体内的 *Wolbachia* 诱导的 CI 显著下降，灰飞虱体内 *Wolbachia* 诱导 CI 强度并没有受雄虫日龄的影响。定量 PCR 检测发现白背飞虱雄虫体内 *Wolbachia* 的量只有灰飞虱雄虫体内菌量的 1/20。随着雄虫日龄的增加，两种飞虱体内 *Wolbachia* 的量均显著下降，但灰飞虱体内的菌量仍然高于白背飞虱。由此推测，雄虫日龄增加会导致 *Wolbachia* 菌量的下降，*Wolbachia* 菌量下降到一定的临界值时，*Wolbachia* 诱导 CI 的能力受到影响。同样，在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中，雄虫日龄对 *Wolbachia*(*wDm*)诱导 CI 强度的作用非常明显。1 日龄的雄虫诱导的 CI 很强烈(大于95%的卵不能正常孵化)，随着日龄增大 CI 的强度显著下降，5 日龄的雄虫不能诱导 CI(Reynolds and Hoffmann, 2002)。随后，Reynolds 等(2003)对黑腹果蝇内的 *Wolbachia* 的变种(*popcorn*)研究发现，*popcorn* 株系诱导 CI 的能力也随雄虫日龄的增大而急剧下降。Duron 等(2007)对尖音库蚊 *Culex pipiens* 的研究发现，雄虫日龄对 CI 的强度没有影响，对菌量的研究发现，30 日龄的雄虫体内的菌量是 2 日龄雄虫体内菌量的 10 倍。同样，我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 强度不受雄螨日龄的影响。而对江苏徐州和辽宁兴城种群 *Wolbachia* 菌量的研究也发现，*Wolbachia* 的量随着雄螨日龄的增大而增多，10 日龄的雄螨体内的菌量是 2 日龄雄螨体内菌量的 10 倍。另外，江苏徐州种群的雄螨菌量比辽宁兴城种群的菌量要多，但江苏徐州种群的 CI 强度并没有比辽宁兴城种群的 CI 强度强。由此可见，我国二斑叶螨体内的 *Wolbachia* 的菌量对 CI 强度没有影响，尽管 *Wolbachia* 菌量在第 9 天达到最大，但对诱导的 CI 结果没有影响。雄螨日龄对 *Wolbachia* 的菌量以及诱导 CI 的影响可能与其寄主有一定的关系。

3.2 温度对 CI 的影响

我们的研究还发现，温度对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 能力没有影响。目前，温度对 *Wolbachia* 菌量变化及种群动态的影响的研究较多，但是温度影响 *Wolbachia* 操纵寄主生殖的研究则较少。Mouton 等(2006)研究了在不同温度下(14℃, 18℃, 20℃ 和 26℃)一种寄生蜂 *Leptopilina heterotoma* 体内 *Wolbachia* 菌量以及 CI 强度的变化。结果发现，26℃下雌雄虫的菌量最高，但是温度对 CI 的强度并没有影响。相反，对果蝇的研究发现，*D. bifasciata* 体内的 *Wolbachia* 在 18℃下的菌量高于26℃下的菌量(Hurst *et al*., 2000)，拟果蝇 *D. simulans* 体内的 *Wolbachia*(*wRi*)在 19℃下的菌量高于25℃下的菌量。本研究首次报道了温度对二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 能力的影响。以往对二斑叶螨的研究发现，去除二斑叶螨体内 *Wolbachia* 的临界温度为 32 ± 0.5℃ (van opijnen and Breeuwer, 1999)。30℃的高温处理后，通过 PCR 检测，我们确认感染品系依然 100% 感染 *Wolbachia*，由此可见 30℃的高温并没有能去除 *Wolbachia*。对于辽宁兴城种群感染的 *Wolbachia*，在 20℃低温、25℃适温(Xie *et al*., 2011)以及 30℃高温下诱导 CI 的强度没有显著的差异。不同温度下不亲和组合间的孵化率(42.57 ± 3.00 ~ 46.79 ± 2.83; $F_{2,113} = 0.588$, $P > 0.05$, ANOVA)与性比(32.29 ± 3.77 ~ 37.08 ± 2.85; $F_{2,113} = 0.482$, $P > 0.05$, ANOVA)均没有显著差异。由此可见，温度并没有影响二斑叶螨体内 *Wolbachia* 诱导 CI 的强度，而 20℃低温以及 30℃的高温对 *Wolbachia* 的菌量如何变化还有待进一步研究。

3.3 影响 CI 的因子

江苏徐州种群雄螨中 *Wolbachia* 的菌量显著高于辽宁兴城种群，由此可见，江苏徐州种群中 *Wolbachia* 不能诱导 CI 与 *Wolbachia* 菌量无关。同时，江苏徐州与辽宁兴城种群中 *Wolbachia* 所表现出的不同 CI 表型与温度、雄螨日龄也无关。本研究发现辽宁兴城和江苏徐州两个地理种群的 COⅠ序列完全一致。核糖体 DNA 中的 ITS2 区段序列也完全一致(Xie *et al*., 2008)。由此可见，辽宁兴城和江苏徐州两个地理种群的亲缘关系很近。用变异度高的 *wsp* 基因序列比较 *Wolbachia* 株系的亲缘关系。江苏徐州种群体内的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列与辽宁兴城种群相比有 3 个碱基的差异，第 181 处碱基有 C 与 T 的置换，在第 457 处碱基有 T 与 C 的置换，第 489 处碱基有 G 与 A 的置换(Xie *et al*., 2011)。因此推断，*Wolbachia* 株系可能是造成江苏徐州种群与辽宁兴城种群 CI 表达差异的主要原因。通过 BLAST 工具(NCBI 网站)对我国二斑叶螨体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列同源性比较分析发现，江

苏徐州种群内的 *Wolbachia* 与日本二斑叶螨 G1 种群内能诱导 CI 的 *Wolbachia* 具有相同的 *wsp* 基因序列。因此，也不能排除寄主遗传背景的作用。寄主遗传背景对 CI 的影响在果蝇中也有多次报道。感染黑腹果蝇的 *wDm* 在黑腹果蝇中能诱导较弱的 CI (后代胚胎死亡率 18% ~32%)，通过显微注射转入拟果蝇中后能引起高强度的 CI(后代胚胎死亡率 > 98%)(Poinsot *et al*., 1998)。同样 *popcorn* 株系在黑腹果蝇中不能引起 CI，转入拟果蝇后能引起较强强度的 CI(McGraw *et al*., 2001)。由此推测，江苏徐州种群内的 *Wolbachia* 不能诱导 CI 可能是 *Wolbachia* 株系以及寄主遗传背景相互作用的结果。今后的研究中，还需要通过显微注射将江苏徐州种群的 *Wolbachia* 注射进入辽宁兴城种群，或将辽宁兴城种群的 *Wolbachia* 注射进江苏徐州种群，阐明 *Wolbachia* 株系和寄主遗传背景在我国二斑叶螨种群不同 CI 表型中所起的作用。

参 考 文 献 (References)

Breeuwer JAJ, Jacobs G, 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol*., 20: 421 - 434.

Clancy DJ, Hoffmann AA, 1998. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomol. Exp. Appl*., 86: 13 - 24.

Duron O, Fort P, Weill M, 2007. Influence of aging on cytoplasmic incompatibility, sperm modification and *Wolbachia* density in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, 98: 368 - 374.

Hoffmann AA, Turelli M, Harshman LG, 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 126: 933 - 948.

Hong XY, Gotoh T, Nagata T, 2002. Vertical transmission of *Wolbachia* in *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus mori* Yokoyama (Acari: Tetranychidae). *Heredity*, 88: 190 - 196.

Hurst GDD, Johnson AP, von der Schulenburg JHG, Fuyama Y, 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, 156: 699 - 709.

Ikeda T, Ishikawa H, Sasaki T, 2003. Infection density of *Wolbachia* and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *J. Invertebr. Pathol*., 84: 1 - 5.

Jamnongluk W, Kittayapong P, Baisley KJ, O'Neill SL, 2000. *Wolbachia* infection and expression of cytoplamsic incompatibility in *Armigeres sublbatus* (Diptera: Culicidea). *J. Med. Entomol*., 37: 53 - 57.

Karr TL, Yang W, Feder ME, 1998. Overcoming cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 391 - 395.

Kittayapong P, Mongkalangoon P, Baimai V, O'Neill SL, 2002. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, 88: 270 - 274.

McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O'Neill SL, 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 2565 - 2570.

Miao H, Hong XY, Xie L, Xue XF, 2004. Sequencing and sequence analysis of the *wsp* gene of *Wolbachia* in *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 47(6): 738 - 743. [苗慧，洪晓月，谢霖，薛晓峰，2004. 朱砂叶螨体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与分析. 昆虫学报，47(6): 738 - 743]

Moret Y, Juchault P, Rigaud T, 2001. *Wolbachia* endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity*, 86: 325 - 332.

Mouton L, Henri H, Bouletreau M, Vavre F, 2006. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology*, 132: 49 - 56.

Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutlerrez J, Boursot P, 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Mol. Biol*., 5(4): 281 - 285.

Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, Deng K, 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 31: 727 - 737.

O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH, 1997. Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford University Press, New York. 214.

O'Neill SL, Karr TL, 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, 348: 178 - 180.

Perrot-Minnot MJ, Cheval B, Migeon A, Navajas M, 2002. Contrasting effects of *Wolbachia* on cytoplasmic incompatibility and fecundity in the haplodiploid mite *Tetranychus urticae*. *J. Evol. Biol*., 15: 808 - 817.

Poinsot D, Bourtzis K, Markakis G, Savakis C, Merçot H, 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics*, 150: 227 - 237.

Reynolds KT, Hoffmann AA, 2002. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genet. Res*., 80: 79 - 87.

Reynolds KT, Thomson LJ, Hoffmann AA, 2003. The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain *popcorn* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 164: 1027 - 1034

Sakamoto H, Ishikawa Y, Sasaki T, Kikuyama S, Tatsuki S, Hoshizaki S, 2005. Transinfection reveals the crucial importance of *Wolbachia* genotypes in determining the type of reproductive alteration in the host. *Genet. Res*., 85: 205 - 210.

Sinkins SP, Braig HR, O'Neill SL, 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 261: 325 - 330.

Turelli M, Hoffmann AA, 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, 140: 1319 – 1338.

van Opijnen T, Breeuwer JA, 1999. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Exp. Appl. Acarol*., 23: 871 – 881.

Vavre F, Dedeine F, Quillon M, Fouillet P, Fleury F, Bouletreau M, 2001. Within-species diversity of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. *Evolution*, 55: 1710 – 1714.

Vavre F, Fleury F, Varaldi J, Fouillet P, Boulétreau M, 2002. Infection polymorphism and cytoplasmic incompatibility in Hymenoptera-*Wolbachia* associations. *Heredity*, 88: 361 – 365.

Xie L, Xie RR, Zhang KJ, Hong XY, 2008. Genetic relationship between the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and the two-spotted mite *T. urticae* Koch in China based on the mtDNA COI and rDNA ITS2 sequences. *Zootaxa*, 1726: 18 – 32.

Xie RR, Chen XL, Hong XY, 2011. Variable fitness and reproductive effects of *Wolbachia* infection in populations of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch in China. *Appl. Entomol. Zool*., 46: 95 – 102.

(责任编辑: 袁德成)